

РАЗДЕЛ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ ТИАМИНА НА УРОВЕНЬ НИТРАТОВ И ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Адамчук Р.И.¹, Коновалова Н.В.¹, Пилецкая Т.П.¹, Степура И.И.¹,
Савостьяник С.А.², Якубцевич Р.Э.², Спас В.В.

*ГНУ «Институт биохимии НАН Беларуси»¹,
УЗ «Гродненская областная клиническая больница»²,
УО «Гродненский государственный медицинский университет»³,
Беларусь*

Оксид азота представляет собой исключительно важный регулятор физиологических функций в организме человека и животных. Это, в первую очередь, касается таких важных физиологических процессов, как вазодилатация, регуляция внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , цитотоксическое действие при активации макрофагов и т.д. [1].

Концентрация оксида азота являются одним из главных факторов, определяющих его биологические эффекты. При низких концентрациях (<1 мкМ), преобладают прямые эффекты оксида азота. При более высоких концентрациях (>1 мкМ), преобладают непрямые, вторичные эффекты, обусловленные наработкой активных форм азота и образованием различных промежуточных соединений [2].

Вторичные эффекты оксида азота, обусловлены взаимодействием NO с O_2 или O_2^- , и включают нитрозилирование, окисление или нитрование. При воспалительных процессах, кроме оксида азота, нарабатываются в больших количествах также супероксид анион, который с оксидом азота образует пероксинитрит. Последний нитрует тирозинильные остатки белков с образованием 3-нитротирозина. Нитрование тирозинильных остатков белков является биологическим маркером, свидетельствующим об усилении генерации оксида азота и образовании на его основе других активных форм азота. Целью данной работы является изучение продуктов азотистого обмена при почечной недостаточности (нитраты, S-нитрозотиолы), а также изучение нарушения лиганд-связывающих свойств сывороточного альбумина вследствие нитрования тирозинильных остатков, расположенных в связывающих центрах альбумина.

Материал и методы исследования

Пероксинитрит получали по ранее описанному методу [3]. Нитрование тирозинильных остатков и триптофанильного остатка-214 сывороточного альбумина человека измеряли по тушению белковой флуоресценции. Лиганд-связывающую способность сывороточного альбумина здоровых доноров и больных с хронической почечной недостаточностью оценивали с помощью маркерных соединений - тиазолидина и флуоресцентного зонда АНС. Концентрацию нитрита определяли с помощью реагента Грисса, регистрируя образующееся диазосоединение на 520 нм [4]. Концентрацию нитратов также определяли с помощью реагента Грисса, но после предварительной инкубации в течении 24 часов с пластинками металлического кадмия [5]. Концентрацию оксида азота связанного по сульфгидрильным группам определяли используя хлорид ртути [6]. Содержание нитрита, депонированного оксида азота и нитрата измеряли в плазме крови 25 больных с терминальной хронической почечной недостаточностью до и после гемодиализа. У всех исследуемых пациентов проводился бикарбонатный гемодиализ 3 раза в неделю по артерио-венозному варианту на аппаратах «искусственная почка» (тип 4008В) (Fresenius, Германия) с использованием полисульфоновых мембран (Fresenius, Германия). Доступ к сосуду осуществляли через естественную артерио-венозную фистулу. Скорость кровотока составила 220-260 мл/мин, длительность сеанса - 240-270 мин. Адекватность гемодиализа определялась показателем Kt/V, который был 1,2-2,3 у всех больных. Средний диализный стаж пациентов составил 4,6 лет. Продолжительность курса лечения тиаминном, с максимальной суточной дозой 150 мг (через сутки), составляла две недели.

Результаты исследований и их обсуждение

Содержание нитрита и депонированного оксида азота снижалось при хронической почечной недостаточности. Среднее значение суммарной концентрации нитрита и депонированного оксида азота в составе белков плазмы не превышало 1 мкМ и было ниже по сравнению с концентрацией нитритов и S-нитрозотиолов в крови здоровых доноров

Концентрация нитратов, напротив, сильно возрастала (табл. 1). У больных с терминальной хронической почечной недостаточностью уровень нитратов повышался и в 2-8 раз превышал уровень нитратов в плазме крови здоровых доноров. После двухнедельного курса лечения тиаминном с суточной дозой 150 мг, наблюдали снижение уровня нит-

ратов в плазме большинства больных хронической почечной недостаточностью IV ст. до уровня нитратов в плазме здоровых доноров.

Таблица .

Содержание нитратов в плазме крови больных с терминальной хронической почечной недостаточностью до и после гемодиализа без применения тиамина и после применения тиамина.

Порядковый номер больного	Содержание нитратов в плазме крови (мкМ)		Содержание нитратов в плазме крови (мкМ) после 2-х недельного курса приёма тиамина	
	До гемодиализа	После гемодиализа	До гемодиализа	После гемодиализа
1	52,85	-	45,7	5,78
2	77,54	40,03	59,60	23,76
3	66,1	37,99	70,84	32,29
4	50,21	38,7	12,23	14,12
5	63,072	41,662	24,17	5,70
6	58,539	40,053	4,364	37,23
7	124,5	92,23	87,29	41,48
8	59,08	25,86	32,32	16,33
9	26,41	36,32	42,50	24,15
Здоровые доноры (n=3)	-	-	26,89±6,5	-

При патологических состояниях организма, сопровождающихся развитием эндогенной интоксикации, вызванной продуктами азотистого обмена, значительно возрастает функциональная нагрузка на альбумин, вследствие увеличения в крови циркулирующих гидрофобных и амфифильных метаболитов

Кроме того, может происходить разрушение лиганд-связывающих центров, вследствие нитрования тирозинильных остатков. Например, при высоких молярных избытках пероксинитрита по отношению к сывороточному альбумину человека (1:8) флуоресценция тирозинильных остатков и триптофанильного остатка-214 снижалась в 5 раз.

В сывороточном альбумине человека наиболее легко нитруются пероксинитритом тирозинильные остатки 138, 411 и единственный триптофанильный остаток-214, что сопровождается снижением связывания ряда маркерных соединений, таких как АНС, диазепам, тиазолидин.

Связывающая способность сывороточного альбумина больных с терминальной хронической почечной недостаточностью полностью не

восстанавливалась после гемодиализа, а сывороточный альбумин обладал спектрально-флуоресцентными свойствами, характерными для молекул альбумина после воздействия пероксинитрита.

Тиамин оказывал защитный эффект и ингибировал нитрование ароматических остатков белка под действием пероксинитрита. Как известно, тиамин и его метаболиты являются эффективными скэвенджерами пероксинитрита [7]. Поэтому, мы предполагаем, что благоприятный терапевтический эффект тиамина сопровождающийся тенденцией к нормализации уровня продуктов азотистого обмена, частичным восстановлением лиганд-транспортных свойств сывороточного альбумина может быть связан с разрушением токсичного пероксинитрита.

Литература

1. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) *Nature*, vol. 327, pp. 524 – 526.
2. Wink D.A., Mitchell J.B. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 25, pp. 434–456.
3. Uppu R.M., Pryor W.A. // *Methods Enzymol.*-1996.-Vol. 269.-P. 322-329.
4. Green D., Wagner A., Glogowski J. e.a. *Anal. Biochem.*-1982.-Vol. 126.-P. 131-135.
5. Pietraforte D., Mallozzi C., Scorza G., Minetti M. *Biochemistry*.-1995.-Vol. 34.-P. 1177-1185.
6. Saville B. *Analyst*.-1958.-Vol. 83.-P. 670-672.
7. Stepuro I.I. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 2005, vol. 72, p. 115-127.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА С ТИАМИНОМ

Адамчук Р.И., Степура А.И., Степура И.И.

ГНУ «Институт биохимии НАН Беларуси», Беларусь

Как известно, пероксинитрит (ONOO⁻) – сильный окислитель, ответственный за сосудистые повреждения при диабете и атеросклерозе. Пероксинитрит эффективно нитрует остатки тирозина в различных ферментах и таким образом инактивирует их [1]. Одним из наиболее восприимчивых сосудистых ферментов к нитрующему действию пероксинитрита является простаглицинсинтаза [2]. Простаглицин - основной протектор стенки сосудов при диабетических и атеросклеротических ангиопатиях, в то время как роль оксида азота проявляется главным образом в защите против артериального тромбоза [3]. Ранее было показано, что тиамин окисляется пероксинитритом с образованием флуоресцирующих продуктов, а также дисульфида тиамина [i]. В данной работе исследовали ингибирование тиамином и его гидро-